

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

институт

кафедра

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

подпись инициалы, фамилия
« ____ » _____ 20 ____ г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Влияние β -амилоида на развитие инсулинорезистентности нейронов головного
мозга
тема

код и наименование направления

код и наименование магистерской программы

Научный руководитель

подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

Выпускник

подпись, дата инициалы, фамилия

Рецензент

подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

Красноярск 2018

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	4
1 Обзор литературы	6
1.1 Болезнь Альцгеймера и ее патогенез.....	6
1.1.1 Роль β -амилоида	7
1.1.2 Роль тау-белка.....	10
1.1.3 Синаптическая дисфункция и кальциевый гомеостаз.....	11
1.2 Инсулинорезистентность при болезни Альцгеймера	13
1.2.1 Пути передачи инсулинового сигнала	13
1.2.2 Роль инсулина в головном мозге	16
1.2.3 Роль инсулинорезистентности в патогенезе болезни Альцгеймера	18
1.3 Инфламмосомы и нейровоспаление при болезни Альцгеймера.....	20
2 Материалы и методы	23
2.1 Изготовление переживающих срезов	23
2.2 Запись локальных полевых возбуждающих постсинаптических потенциалов.....	25
3 Результаты и их обсуждение.....	27
3.1 Влияние нокаутирования по гену <i>Nlrp3</i> на электрофизиологические характеристики нейронов	Ошибка! Закладка не определена.
3.2 Влияние $A\beta$ на чувствительность нейронов к инсулину.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.2.1 Влияние гиппокампального воспаления на нейроны миндалины	Ошибка! Закладка не определена.
3.2.2 Влияние воспаления в мозжечке на нейроны CA1 зоны гиппокампа	Ошибка! Закладка не определена.
4 Заключение	28
Список сокращений	29
Список использованных источников	31
ПРИЛОЖЕНИЕ А	39

ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	42
-------------------	----

РЕФЕРАТ

Дипломная работа по теме «Влияние β -амилоида на развитие инсулинорезистентности нейронов головного мозга» содержит 47 страниц текстового материала, 10 иллюстраций, 4 таблицы, 2 приложения, 77 использованных источников.

БОЛЕЗНЬ АЛЬЦГЕЙМЕРА, АМИЛОИД-БЕТА, NLRP3 ИНФЛАММАСОМЫ, ИНСУЛИН, ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ

Несмотря на практически столетнюю историю изучения болезни Альцгеймера, ее патогенез до сих пор не изучен в полной мере. В последнее время активно изучаются развивающиеся при болезни Альцгеймера нейровоспаление и инсулинорезистентность. Известно, что бета-амилоид способен инициировать формирование NLRP3 инфламмасом, приводящих к пироптозу клеток. Экспрессия инфламмасом данного типа коррелирует с развитием инсулинорезистентности клеток периферической ткани. Возможно, подобная корреляция наблюдается и в нейронах головного мозга.

Цель работы – определить влияние бета-амилоида на развитие инсулинорезистентности нейронов нескольких взаимосвязанных областей мозга и оценить вовлеченность NLRP3 инфламмасом в этот процесс.

В работе описано влияние нокаутирования по гену *Nlrp3* на электрофизиологические характеристики нейронов латерального ядра миндалины, CA1 и CA3 зоны гиппокампа. Кроме того, описано влияние инсулина на нейроны латерального ядра миндалины и CA1 зоны гиппокампа. У мышей нокаутных по гену *Nlrp3* наблюдается нарушение нейромодуляторных эффектов инсулина в нейронах латерального ядра миндалины. Показано, что присутствие бета-амилоида в одной зоне мозга приводит к нарушению нейромодуляторных свойств инсулина в связанных с ней областях.

Введение

Болезнь Альцгеймера (первичная дегенеративная деменция альцгеймеровского типа, БА) — наиболее распространенная форма деменций позднего возраста с постепенным началом в пресенильном или старческом возрасте, неуклонным прогрессированием расстройств памяти и сознания вплоть до полного распада личности[1]. К деменциям относят целый ряд нейродегенеративных заболеваний, характеризующиеся нарушением высших когнитивных функций.

Нейропатологически БА характеризуется наличием двух типов белковых агрегатов в нервных тканях больных: амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков. Амилоидные бляшки – компактные сферические внеклеточные отложения, состоящие из небольшого белка (~4 кДа), называемого β -амилоидным пептидом (А β). Эти внеклеточные включения обычно обнаруживаются в отделах лимбической системы мозга, таких как гиппокамп, а так же в корковых и подкорковых отделах[2]. Нейрофибриллярные клубки – это внутриклеточные агрегаты, основным компонентом которых являются агрегированные формы гиперфосфорилированного белка тау. Эти нитевидные включения встречаются как в аксонах, так и в телах нейронов.

Наличие белковых агрегатов в мозге пациентов с БА сочетается с дополнительными патологическими изменениями: синаптической дисфункцией, атрофией мозгового вещества, выборочным истощением нейромедиаторных систем и присутствием патогистологических структур других типов[2]. За последнее десятилетие накопилось большое количество данных, показывающих, что важную роль в развитии и прогрессировании БА играют локальная инсулинорезистентность и нейровоспаление [3–8]. Сейчас активно исследуется их молекулярная взаимосвязь. Например, известны некоторые молекулярные механизмы, опосредующие влияние А β как на

нейровоспаление, так и на развитие инсулинорезистентности. Так, растворимые олигомеры Аβ внутри нейронов инициируют сборку NLRP3 инфламмасом, с последующим каспаза-1-опосредованным процессингом и пироптозом клеток. В периферических тканях уровень экспрессии инфламмасом данного типа тесно коррелирует с толерантностью клеток к инсулину[9]. Кроме того, в экспериментах на клеточных культурах нейронов гиппокампа было показано, что Аβ может оказывать существенное влияние на развитие инсулинорезистентности [10, 11]. Однако мало известно о влиянии Аβ в одной зоне мозга на развитие инсулинорезистентности других связанных с ней зон. Так же не известно, вовлекаются ли NLRP3 инфламмасы в развитие инсулинорезистентности в головном мозге.

Таким образом, цель данной работы заключается в определении влияния Аβ на развитие инсулинорезистентности нейронов нескольких взаимосвязанных областей мозга и оценки вовлеченности NLRP3 инфламмасы в этот процесс. В работе использовались мыши нокаутные по гену *Nlrp3*, кодирующему данный тип инфламмасы. Локальное нейровоспаление моделировалось при помощи стереотаксического введения Аβ в гиппокамп и мозжечок. Электрическая активность нейронов регистрировалась при помощи записи полевых возбуждающих постсинаптических потенциалов (пВПСП). Для выполнения поставленных целей необходимо было выполнить следующие задачи:

1. Определить влияние нокаутирования по гену *Nlrp3* на базовые электрофизиологические характеристики нейронов исследуемых зон;
2. Определить влияние инсулина на нейроны латерального ядра миндалины у мышей дикого типа и нокаутных по гену *Nlrp3*;
3. Определить влияние инсулина на нейроны латерального ядра миндалины у мышей дикого типа и нокаутных по гену *Nlrp3* при инъекции Аβ в гиппокамп;
4. Определить влияние инсулина на нейроны CA1 зоны гиппокампа у мышей дикого типа;

5. Определить влияние инсулина на нейроны CA1 зоны гиппокампа у мышей дикого типа при инъекции A β в кору мозжечка.

1 Обзор литературы

1.1 Болезнь Альцгеймера и ее патогенез

Существует более 50 различных видов деменций, включая сосудистую деменцию, болезнь Паркинсона, болезнь Пика, деменцию с тельцами Леви. Однако, около 50% всех диагностируемых случаев приходится именно на долю БА. По данным Международной ассоциации обществ болезни Альцгеймера «Alzheimer's Disease International», общее число больных в мире, страдающих деменцией, в 2015 году составило 46,8 млн человек, а к 2050 году возрастет до 131,5 млн человек. Каждый год по всему миру регистрируется около 9,9 млн новых случаев деменции, что означает 1 случай каждые 3,2 секунды. По статистике общества болезни Альцгеймера «Alzheimer's Association», БА стоит на 6 месте среди причин смерти американских граждан. Расходы на содержание больных в США в 2018 году составило около 227 млрд долларов, а к 2050 году прогнозируется рост затрат до более чем 1 триллиона долларов.

Первый случай БА был описан в 1906 году немецким психиатром Алоисом Альцгеймером. Его пациентке, Августе Детер, было всего 51 год на момент обращения. До сих пор возраст остается самым значимым фактором риска: 10% людей возрастом 65 лет имеют деменцию Альцгеймеровского типа и каждые 5 лет после 65 лет заболеваемость удваивается[12]. Большинство форм БА являются спорадическими и возникают в возрасте 65-70 лет (LateOnsetAlzheimer'sDisease, LOAD), однако примерно в 6% случаев первые симптомы деменции проявляются уже в возрасте от 30 до 65. Такие случаи выделяют в семейные формы с ранним началом (Early-OnsetFamilialAlzheimer'sDisease, EOFAD). Семейные формы связаны с наследованием мутаций в генах *APP*, *PSEN1* и *PSEN2* по аутосомно-доминантному типу. В настоящее время активно идет поиск генов, ассоциированных со спорадической формой БА. Выявлены сотни генов

кандидатов, среди которых стоит отметить ген *ApoE*, кодирующий аполипопротеин E. Носители аллели ApoE ϵ 4 имеют в 3 раза более высокий риск заболевания, а в случае гомозиготы по данной аллели – в 12 раз [12].

До сих пор не существует методов, способных полностью излечить или хотя бы существенно замедлить прогрессирование болезни. Несмотря на более чем столетнюю историю изучения, этиология и патогенез БА по-прежнему остаются до конца не выясненными.

1.1.1 Роль β -амилоида

A β является основным компонентом диффузных и синильных бляшек. Он образуется путем протеолиза белка предшественника бета-амилоида (Amyloid-PrecursorProtein, APP). Ген, кодирующий APP, располагается на 21 хромосоме и содержит как минимум 19 экзонов, кодирующих изоформы APP с молекулярными массами от 100 до 140 кДа [13].

Белки семейства APP являются мембранными белками I типа: N-конец располагается во внеклеточном пространстве, а C-конец – во внутриклеточном. Известно, что APP принимает участие в процессах адгезии, миграции и пролиферации клеток, а также в поддержании гомеостаза холестерина и меди. В головном мозге APP вовлечен в развитие нейронов, формирование и восстановление синапсов и процессы синаптической пластичности [14]. Нокаутирование по гену *APP* приводит к относительно слабым неврологическим нарушениям. Вероятно, это обусловлено присутствием других членов семейства APP: APLP1 и APLP2 (amyloid-precursor-likeprotein-1 и -2). Действительно, совместное нокаутирование по *APP* и *APLP*, либо по *APLP1* и *APLP2* приводит к смерти в раннем постнатальном периоде [15]. Тем не менее, до сих пор нет достаточно полного понимания роли APP в головном мозге.

На сегодняшний день вовлеченность APP в патогенез БА детально изучается. Процессинг APP может протекать двумя различными путями (рис. 1) при участии α , β и γ -секретаз. При неамилоидогенном протеолизе α -секретаза расщепляет APP прямо посреди A β фрагмента (между 16 и 17 аминокислотным остатком) с образованием внеклеточного растворимого фрагмента APPs α и внутриклеточного фрагмента длиной 38 аминокислотных остатков C38. Дальнейшее расщепление C38 происходит при помощи γ -секретазы с образованием P3-фрагмента, который, несмотря на присутствие в амилоидных бляшках, считается неамилоидогенным пептидом, и внутриклеточного домена APP (ACID). В случае амилоидогенного пути β -секретаза, известная так же как BACE1 (β -site APP-cleaving enzyme), расщепляет APP в области N-конца A β -пептида с образованием более короткого растворимого фрагмента (APPs β) и амилоидогенного C-концевого фрагмента длиной 99 аминокислот (C99). Расщепление C99 γ -секретазой приводит к высвобождению фрагмента ACID и непосредственно самого A β различной длины (A β 40, A β 42).

Ингибирование одного из путей протеолиза не оказывает влияние на другой, поскольку α и β -секретазы функционируют независимо друг от друга. В нормальных физиологических условиях расщепление APP происходит по обоим путям, причем амилоидогенный путь более выражен в нейрональных клетках [16].

A β вносит существенный вклад в развитие и прогрессирование спорадических и наследственных форм БА. Известно, что он способен оказывать влияние на активность потенциал-управляемых кальциевых каналов (N-, P- и Q-типов), на никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR), ионотропные глутаматные рецепторы α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (AMPA) и N-метил-D-аспартата (NMDAR), допаминовые и серотониновые рецепторы. Взаимодействие с этими рецепторами может приводить к эксайтотоксичности и массовой гибели нейронов гиппокампа и больших полушарий [17]. Кроме того, A β способен формировать неселективные ионные каналы в плазматической мембране,

обогащенной фосфатидилсерином, нарушая обмен ионов между клеткой и внеклеточной средой. Так же известно, что A β способен нарушать работу ключевых ферментов митохондрий, приводя к окислительному стрессу и гибели нейронов[17].

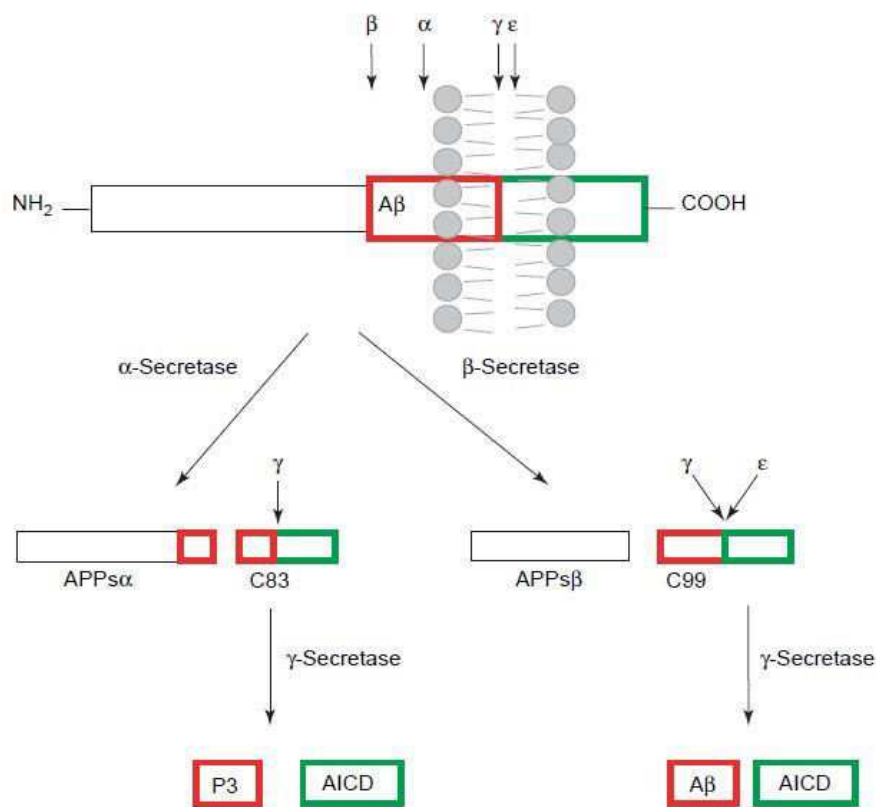


Рисунок 1 – Пути протеолиза APP[18]

В течение долгого времени центральной гипотезой патогенеза являлась «амилоидная гипотеза», согласно которой именно накопление амилоидных пептидов является первоначальным фактором в патогенезе. Другими словами, причиной БА является дисбаланс между образованием и выведением A β [19]. В пользу этой гипотезы говорит тот факт, что гены, ассоциированные с наследственными формами БА, в той или иной степени связаны с регуляцией метаболизма A β . Было идентифицировано более 32 мутаций в гене *APP*, приводящих к гиперпродукции A β 42. Гены *PSEN1* и *PSEN2* кодируют белки пресенилин-1 и пресенилин-2, входящие в состав γ -секретазы. Известно более 176 разных мутаций, связанных с EOFAD, в гене белка пресенилин-1 и 14

мутаций в гене белка пресенилин-2[20]. Основная проблема данной гипотезы заключается в том, что у значительного числа здоровых людей обнаруживаются синильные бляшки при отсутствии каких-либо когнитивных нарушений[21]. Фактически, амилоидная гипотеза привела к малопродуктивным подходам в поиске терапии БА.

1.1.2 Роль тау-белка

Нейрофибриллярные клубки — это нитевидные включения, накапливающиеся в значительном количестве в мозге пациентов с БА. Данные патологические включения также встречаются и при других нейродегенеративных заболеваниях, включая фронтотемпоральную деменцию с паркинсонизмом, сцепленную с 17-й хромосомой, болезнь Пика, прогрессивный супрануклеарный паралич и кортикобазальную дегенерацию. Основным компонентом нейрофибриллярных клубков является белок тау, ассоциированный с микротрубочками. В нормальном состоянии тау представляет собой растворимый белок, способствующий сборке и стабилизации микротрубочек. В гиперфосфорилированном виде тау теряет способность взаимодействовать с микротрубочками. Это приводит к увеличению свободного белка, который агрегирует с образованием нитевидных волокон, нарушая, таким образом, функционирование аксонального транспорта [22].

При моделировании тау-патии на мышах путем введения мутаций в ген *MAPT*, кодирующий тау, развивается достаточно выраженная нейрофибриллярная патология с последующим развитием нейродегенерации [23]. Однако, у мышей трансгенных и по гену *APP*, и по гену *MAPT* развивается более выраженная тау-патия, чем у мышей, трансгенных только по *MAPT* [23]. Кроме того, выведение $A\beta$ с помощью иммунотерапии приводит к блокированию ранней тау-патологии. При инъекции антител против $A\beta$ в гиппокамп, выведение $A\beta$ предшествует исчезновению признаков ранней тау-

патологии. А после выведения или деградации антител, сначала восстанавливалась А β -патология, а затем тау-патология[24]. Все это является достаточно серьезным доказательством взаимосвязи А β и тау в патогенезе БА и вторичности таупатии по отношению к накоплению амилоидных бляшек.

Механизмы, посредством которых амилоид стимулирует гиперфосфорилирование тау, в некоторой степени известны. Например, А β способен взаимодействовать с nAChR, активируя митоген-активируемые киназы JNK-1 и ERK. Блокирование взаимодействия А β 42 с nAChR либо ингибирование указанных киназ приводит к уменьшению гиперфосфорилирования тау. Помимо этого, активация JNK-1 ведет к деградации адаптера субстрата инсулинового рецептора 1 (IRS-1) и нарушению инсулин-зависимого фосфорилирования киназ Akt и гликоген-синтазы (GSK3 β), что в свою очередь способствует гиперфосфорилированию тау[25].

1.1.3 Синаптическая дисфункция и кальциевый гомеостаз

Неэффективность терапевтических подходов, направленных против А β , вынудило пересмотреть важность этого пептида в инициации БА. Тем не менее, накопление А β все еще считается одним из важнейших патологических событий. Активно изучается его роль в развитии синаптической дисфункции. О том, что растворимые олигомеры А β способны вмешиваться в процессы синаптической передачи, нарушая NMDAR зависимую долговременную потенцию (ДВП), впервые стало известно в 1998 году[26]. С тех пор достигнут определенный успех в понимании механизмов этого явления.

Действуя как агонист NMDA-рецепторов, А β приводит к их десенсibilизации и последующей эксайтотоксичности [27]. Олигомеры А β были обнаружены не только в синаптической щели, но и непосредственно в самих нейронах, в частности в пресинаптических терминалях[28]. Кратковременное воздействие низких концентраций А β на нейроны приводит к увеличению ДВП и базовой синаптической передачи в целом, тогда как

увеличении концентрации или времени экспозиции приводит, напротив, к уменьшению возбуждающих постсинаптических потенциалов (ВПСП) и NMDAR-зависимой ДВП. Это указывает на способность растворимых Аβ олигомеров постепенно увеличивать концентрацию глутамата в синаптической щели [29, 30]. Влияние Аβ на синаптическую передачу подтверждается в исследованиях людей на разных стадиях БА. При помощи метода функциональной магнитно-резонансной томографии (фМРТ) было показано, что у людей со слабо выраженной симптоматикой наблюдается увеличение синаптической активности в гиппокампе. В то время, как люди с более выраженными симптомами демонстрируют наличие синаптической депрессии [31].

Процесс синаптической передачи очень тесно связан с изменением концентрации ионов кальция внутри нейронов. Кальций является вездесущим внутриклеточным мессенджером, регулирующий огромное количество клеточных процессов. Изменение его концентрации в клетке обусловлено множеством различных мембранных каналов: ROCC (receptor-operated calcium channels), VOCC (voltage-operated calcium channels), SOCC (store-operated calcium channels) и особенно NCX (sodium/calcium exchanger). Очень важную роль в регуляции концентрации ионов кальция играют внутриклеточные кальциевые депо: эндоплазматический ретикулум (ЭПР) и митохондрии. Все это позволяет очень тонко регулировать уровень кальция внутри нейрона. Нарушение этих механизмов может повлечь за собой гибель нейронов с последующим развитием нейродегенерации [32].

Существует масса доказательств того, что нарушение кальциевого гомеостаза тесно связано с нейродегенеративными заболеваниями, в частности с БА. Несколько исследований демонстрируют важную роль кальция для нейропротекторных процессов [33–35]. Нарушение метаболизма амилоида влечет за собой нарушение кальциевого гомеостаза, с последующими когнитивными нарушениями и массовым апоптозом клеток. Как упоминалось выше, Аβ способен формировать неселективные ионные каналы, однако в

большей степени дисбаланс кальция обусловлен нарушением его обмена между ЭПР и внутриклеточной средой. Внутриклеточные олигомеры Аβ нарушают работу кальциевых каналов ЭПР, включая IP3R (inositol 1,4,5-trisphosphate receptor), RyR (ryanodine receptor) и SERCA (sarcoendoplasmic reticulum calcium ATPase) [36–38]. Нарушение кальциевого гомеостаза происходит не только в нейронах головного мозга. В эндотелиальных клетках дисбаланс кальция приводит к окислительному стрессу, что на ранних стадиях приводит к апоптозу и цереброваскулярной патологии при БА [39, 40]. В астроцитах взаимодействие Аβ с кальций-чувствительными рецепторами (Calcium Sensing Receptor, CaSR) приводит к гиперпродукции пероксида азота NO и пероксинитрита ONOO⁻ [41]. Таким образом, описанные выше процессы, в значительной степени способствуют прогрессированию нейродегенерации.

1.2 Инсулинорезистентность при болезни Альцгеймера

Существует обильное количество данных указывающих на то, что изменение инсулиновой сигнализации в головном мозге может быть одним из патологических факторов как нейродегенеративных заболеваний в целом, так и БА в частности. Например, у пациентов с БА наблюдается пониженная чувствительность инсулиновых рецепторов (ИР) головного мозга, гиперфосфорилирование ИР и его субстратов, а так же уменьшение экспрессии рецепторов к инсулину и инсулиноподобному фактору роста (ИФР) [42].

1.2.1 Пути передачи инсулинового сигнала

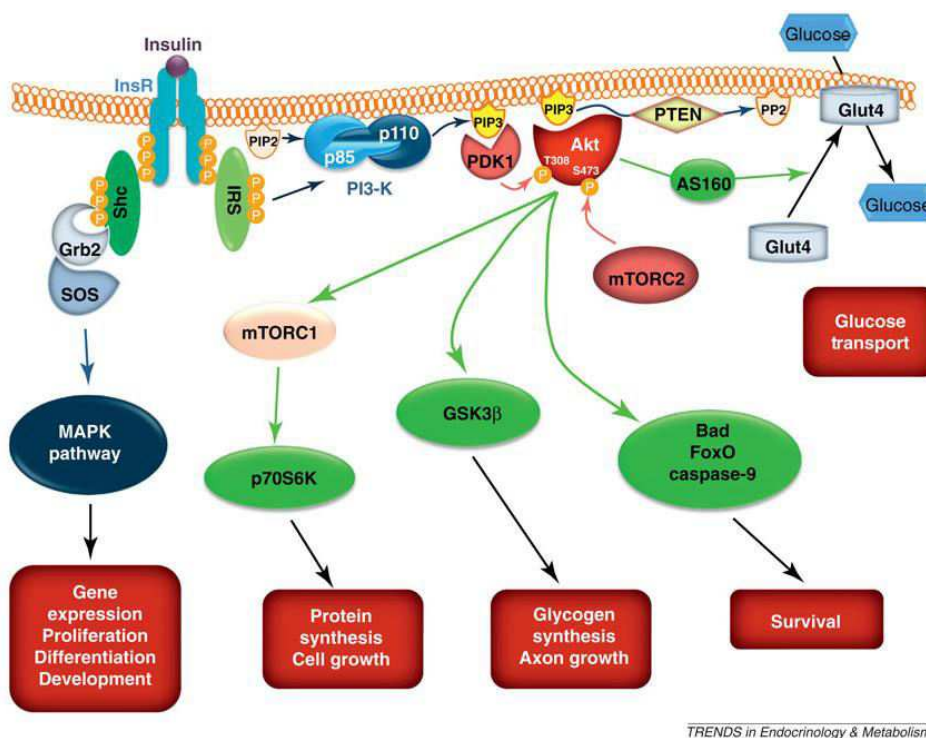
Инсулин является основным анаболическим гормоном, который играет существенную роль в гомеостазе глюкозы, регулируя баланс между выработкой её в печени и поглощением мышцами и жировой тканью. Уровень глюкозы в

крови поддерживается балансом между липолизом в адипоцитах и скелетных мышцах с одной стороны, и глюконеогенезом и гликогенолизом в печени – с другой. Инсулин также регулирует перенос глюкозы в адипоцитах и миоцитах, контролируя транслокацию транспортера глюкозы (GLUT)4 между внутриклеточными пулами и плазматической мембраной [43]. Инсулин связывается с внеклеточной α -субъединицей ИР, что приводит к аутофосфорилированию и активации внутриклеточной β -субъединицы (рис.2). Активированный ИР фосфорилирует несколько внутриклеточных субстратов, включая семейства субстратов инсулинового рецептора (IRS1 – IRS4) и Shc, который затем рекрутирует нисходящие сигнальные молекулы, содержащие домены Src гомолога 2 (SH2), включая субъединицу p85 PI3K и рецептор-связывающий белок-2 фактора роста (Grb-2). Активированная PI3K фосфорилирует фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфат (PIP2) для получения фосфатидилинозитола 3,4,5-трифосфата (PIP3). Повышенный PIP3 стимулирует фосфоинозитид-зависимую протеинкиназу (PDK), что приводит к активации Akt [43].

В нормальных условиях инсулин стимулирует активацию GLUT4 в скелетной мышце через фосфорилирование тирозина IRS и последующую активацию PI3K (рис.2). GLUT4 является основным инсулин-зависимым транспортером глюкозы в мышцах и адипоцитах. Транслокация GLUT4 из внутриклеточных хранилищ в плазматическую мембрану имеет решающее значение для транспорта глюкозы, регулируемого инсулином. PI3K-зависимый сигнальный путь имеет решающее значение для метаболических эффектов инсулина. Именно в этом пути обычно наблюдаются нарушения у людей с метаболическим синдромом и диабетом. Снижение ассоциации субъединицы p85 PI3K и IRS наблюдается у пациентов с ожирением и сахарным диабетом 2 типа (СД2). Снижение экспрессии IRS, ассоциации и активации PI3K также характерны для животных с ожирением [44].

Akt представляет собой серин- или треонинкиназу, активируемую PI3K. Akt отвечает за синтез гликогена, липидов и белков, за выживаемость клеток и

противовоспалительный ответ (рис. 2) [45]. Akt играет решающую роль в развитии инсулинорезистентности мышечной и жировой ткани, регулируя стимулированный инсулином перенос GLUT4, и поэтому неудивительно, что изменения активности Akt обнаруживаются в различных клетках при диабете и инсулинорезистентности. Фосфорилирование Akt снижается в адипоцитах и скелетных мышцах пациентов с СД2. В адипоцитах активация Akt2 тесно коррелирует с транслокацией GLUT4 по средствам активирования инсулином PI3K-пути [43]. У мышей с нокаутом Akt2 или Akt3, но не Akt1 развивается диабет с гипергликемией, гиперинсулинемией, нарушениями транспорта и поглощения глюкозы в мышцах [43]. Возможно, это происходит из-за нарушения действия инсулина в печени и скелетных мышцах. Однако имеются данные о несоответствии между активацией вышеперечисленных сигнальных молекул (IRS-PI3K), активацией Akt и толерантностью к глюкозе [46].



TRENDS in Endocrinology & Metabolism

Рисунок 2 – Пути передачи инсулинового сигнала[43]

Другими участниками развития инсулинорезистентности в периферических тканях, являются субстрат Akt 160 кДа (AS160 или TCB1D4) и

GSK3(рис.2). Akt индуцирует фосфорилирование AS160, который напрямую связывает передачу инсулина с транспортом GLUT4. Инсулин так же активирует гликогенсинтазу – фермент, лимитирующий синтез гликогена. Гликогенсинтаза инактивируется GSK3, которая сама фосфорилируется и инактивируется инсулином по PI3K/Akt-пути [43].

В том случае, когда ИР фосфорилирует Shc, происходит последующая активация митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK) [3]. Активация MAPK-пути инсулином ответственна за экспрессию генов, рост клеток и митогенез. В отличие от PI3K/Akt, активность MAPK остается относительно нормальной при инсулинорезистентности периферических тканей [17]. MAPK может фосфорилировать IRS1 в определенных остатках серина и тем самым интерферировать с PI3K/Akt-путем; Поэтому слишком высокая активность MAPK при уже нарушенном функционировании IRS1, может привести к прогрессированию инсулинорезистентности.

1.2.2 Роль инсулина в головном мозге

Еще в 1970-х годах ЦНС не рассматривалась как инсулин-чувствительный орган. Однако сейчас уже хорошо известно, что инсулин играет очень важную роль в нервной ткани как в норме, так и при различных нейродегенерациях, таких как болезнь Альцгеймера и Паркинсона. В настоящее время ведутся дискуссии о происхождении инсулина в головном мозге. Известно, что он способен преодолевать ГЭБ. Однако существует ряд убедительных доказательств того, что по крайней мере часть инсулина ЦНС вырабатывается в самих нейронах головного мозга [47].

Интересно, что ИР экспрессируются лишь в некоторых областях головного мозга. В большом количестве они обнаруживаются в клетках гранулярного слоя обонятельной луковицы, в мозжечке, гиппокампе, пириформной коре, сосудистом сплетении, дугообразных ядрах гипоталамуса и

миндалине [48]. Такое избирательное расположение уже само по себе намекает на специфическую роль инсулина в головном мозге. В целом, передача инсулинового сигнала в ЦНС ничем не отличается от передачи сигнала в клетках периферических тканей. Разница заключается лишь в том, что определенные участники сигнальных путей в нейронах регулируют ряд специфических для них функций. Так, mTOR вовлечен в регуляцию AMPA-зависимой долговременной депрессии (ДВД) в дофаминовых нейронах вентральной области покрышки [49], а GSK-3 β , помимо регуляции метаболизма гликогена, принимает участие в поддержании целостности микротрубочек.

Одной из основных функций инсулина в ЦНС остается регуляция энергообмена и гомеостаза глюкозы в клетках. Сама по себе глюкоза в головном мозге является не только основным источником энергии, но и важной сигнальной молекулой. Существует два типа нейронов относительно чувствительности к глюкозе: возбуждающиеся и ингибирующиеся. Эти нейроны вовлечены в контроль аппетита, энергообмена и гомеостаза глюкозы в тканях организма [50]. Инсулин же практически не вовлечен в контроль гомеостаза глюкозы самих клеток ЦНС, поскольку инсулин-зависимый транспортер GLUT4 в них экспрессируются в гораздо меньшем количестве в сравнении с инсулин-независимыми транспортерами GLUT1, GLUT2, GLUT3 и GLUT8 [47]. Но, несмотря на это, инсулин все же играет важную роль в регуляции процессов синтеза глюкозы в печени, воздействуя на орексегенические и анорексегенические нейроны различных ядер гипоталамуса [51]. Помимо этого, он играет важную роль в регуляции репродуктивных функций, влияя на секрецию гонадотропных гормонов [52]. Инсулин является очень сильным нейропротекторным агентом, защищающим клетки ЦНС от апоптоза, токсичности A β , окислительного стресса и ишемии [53–55]. Одно из самых интересных его свойств заключается в способности влиять на эффективность синаптической передачи. Механизмы, лежащие в основе нейромодуляторного эффекта инсулина, зависят от области мозга. Например, в дофаминовых нейронах вентральной области покрышки инсулин вызывает

ДВД, индуцируя синтез эндоканнабиноидов [56], а в нейронах CA1 зоны гиппокампа инициирует ДВД, стимулируя регулируемый эндоцитоз AMPA рецепторов [57], что указывает на его роль в процессах обучения и запоминания. Кроме того он способен регулировать плотность рецепторов гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) на постсинаптических окончаниях [58]. Столь обширный спектр физиологических эффектов инсулина в ЦНС говорит о важной его роли в норме и патологии.

1.2.3 Роль инсулинорезистентности в патогенезе болезни Альцгеймера

Многочисленные данные говорят о связи нарушений инсулиновой сигнализации и метаболизма A β (таб. А.1). Ингибирование энергетического метаболизма может изменять процессинг APP и стимулировать образование амилоидных пептидов [59]. Инсулин увеличивает образование APP α и уменьшает накопление A β нейронами [60]. Кроме того, он увеличивает экспрессию инсулин-деградирующего фермента (IDE) через PI3K/Akt путь. Известно, что помимо инсулина IDE способен разрушать пептиды A β в нейрональных и микроглиальных культурах клеток, тем самым уменьшая токсический эффект амилоида. Было показано, что нокаутирование по гену, кодирующему IDE, приводит к увеличению уровня церебрального A β , в то время как гиперэкспрессия этого фермента у мышей с генетической моделью БА приводит к полному исчезновению амилоидных бляшек [61–63].

С другой стороны, олигомеры A β могут значительно нарушать передачу сигнала через ИР. Было показано, что при остром воздействии A β олигомеров на нейроны гиппокампа наблюдается стремительное и существенное снижение ИР на поверхности нейронов, но не общего их числа (рис. 3). Механизм этого эффекта связан с серин/треонин специфическими киназами казеин-киназой 2 (CK2) и Ca²⁺/кальмодулин-зависимой киназой II (CaMKII). Уменьшение

количества ИР в мембране приводит к уменьшению чувствительности нейронов к инсулину[10, 11]. Таким образом, олигомеры амилоида могут приводить к ухудшению памяти и мышления в целом, за счет нарушения инсулиновой сигнализации.

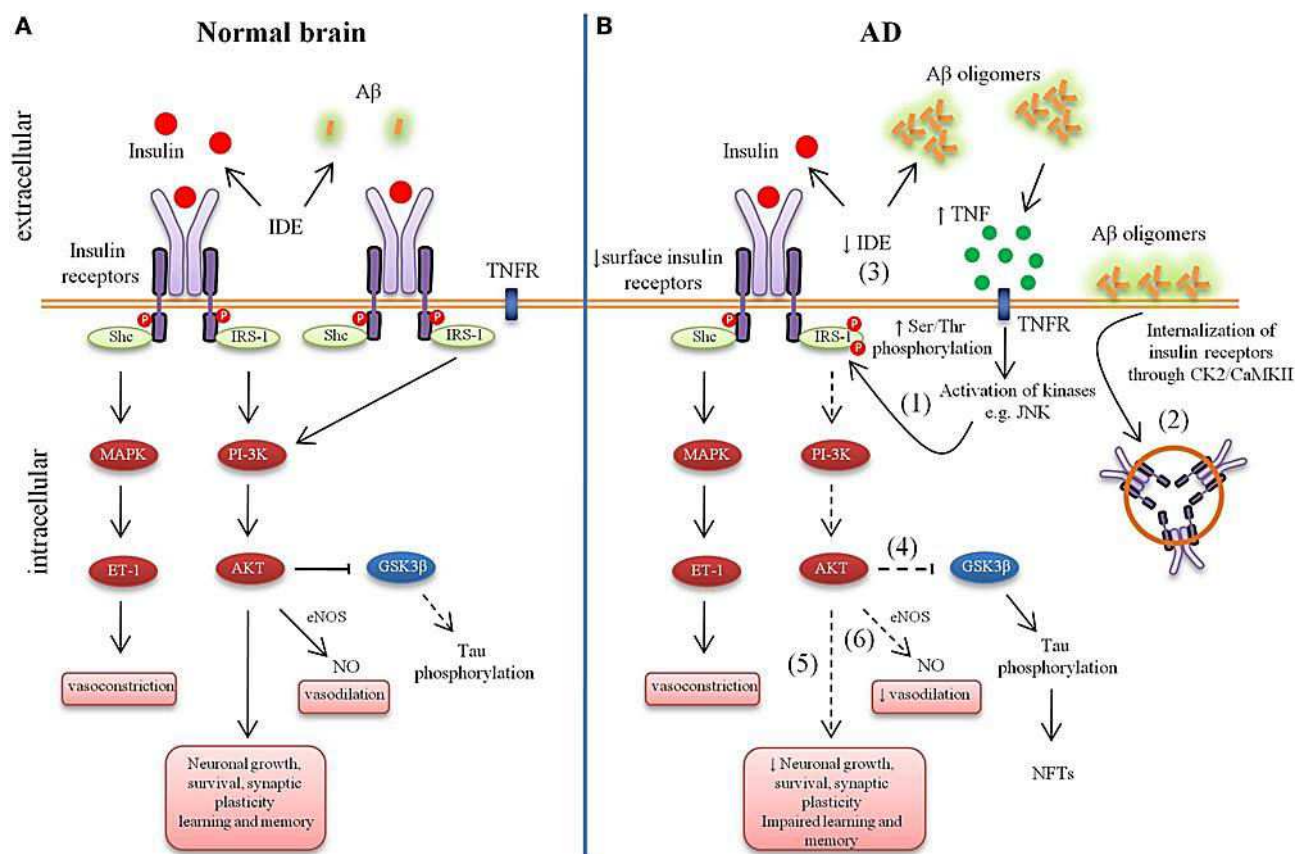


Рисунок 3 – Нарушение инсулиновой сигнализации при БА [3]

Интраназальное введение инсулина приводит к улучшению памяти и процесса обучения как у пациентов с БА, так и у здоровых людей [42]. Дальнейшие исследования показали, что Aβ способен повышать уровень фактора некроза опухоли-α (TNF-α). Это приводит к активации JNK-киназы и, в конечном счете, фосфорилированию остатков серина IRS-1. Фосфорилирование IRS-1 по серину приводит к блокированию передачи инсулинового сигнала и возникновению инсулинорезистентности [64, 65]. Нарушение инсулиновой сигнализации, в свою очередь, значительно стимулирует амилоидогенный путь протеолиза APP и агрегацию Aβ[66]. Возникает замкнутый круг,

в котором олигомеры $A\beta$ стимулируют собственный синтез и агрегацию, нарушая физиологическое действие инсулина.

Помимо амилоидных бляшек, нарушение инсулиновой сигнализации тесно связано с формированием нейрофибриллярных клубков [3]. Нарушение PI3K/Akt пути передачи инсулинового сигнала приводит к гиперфосфорилированию тау-белка за счет ингибирования GSK-3 β . С другой стороны, гиперфосфорилированный тау-белок способствует развитию инсулинорезистентности. Было показано, что развитие таупатии способствует олигомеризации и накоплению инсулина внутри нейронов, что влечет за собой уменьшение количества ИР и последующее развитие инсулинорезистентности [67]. Как и в случае с $A\beta$, инсулинорезистентность и таупатия взаимно влияют друг на друга. Если учесть упомянутый выше факт влияния $A\beta$ на гиперфосфорилирование тау, обнаруживается очень сложная взаимосвязь амилоидоза, таупатии и инсулинорезистентности, развивающихся при БА.

1.3 Инфламмосомы и нейровоспаление при болезни Альцгеймера

Позвоночные животные развили две взаимодополняющие системы обнаружения и очистки патогенов: врожденная и адаптивная иммунные системы. Врожденного иммунитета, который активируется первым в ответ на специфические патогены, обычно бывает достаточно для устранения инфекции. Однако, когда врожденная иммунная система перегружена, запускается адаптивный иммунитет путем активации специфических В- и Т-клеток. Рецепторы, экспрессируемые В и Т-клетками, продуцируются путем перегруппировки соматических генов и гипермутации. Этот процесс позволяет генерировать практически бесконечный репертуар рецепторов к антигенам, позволяя адаптивному иммунитету специфически распознавать любой тип микроорганизмов [68].

Напротив, врожденный иммунитет способен распознавать широкий спектр патогенов, таких как вирусы, бактерии и грибы, но через ограниченное количество рецепторов, называемых рецепторами опознавания паттернов (PRR). PRR экспрессируется многими типами клеток, включая макрофаги, моноциты, дендритные клетки, нейтрофилы и эпителиальные клетки. Они опосредуют раннее выявление патогенов в местах заражения. PRR распознают консервативные микробные сигнатуры, которые называются патоген-ассоциированными молекулярными паттернами или PAMPs. После активации врожденная иммунная система инициирует воспалительную реакцию, выделяя цитокины и хемокины[68]. В результате активируются иммунные клетки в месте заражения и вызывают адаптивный иммунный ответ.

Активация врожденной иммунной системы основана не только на распознавании PAMPs, но также зависит от наличия ассоциированных с повреждениями молекулярных паттернов (DAMPs), высвобождаемых поврежденными клетками. Повреждение тканей и клеточный лизис часто связаны с инфекциями и приводят к высвобождению DAMPs. Распознавание этих молекул иммунной системой не только сигнализирует о продолжающейся инфекции, но также может инициировать восстановление поврежденной ткани. По всей видимости, врожденный иммунитет не просто сканирует клеточное окружение на наличие чужеродных патогенов, но также распознает причиненные ими повреждения[68].

Существует две разновидности PRR: мембранные Toll-подобные рецепторы (TLR) и цитоплазматические Nod-подобные (NLR). И те, и другие способны реагировать как на молекулы DAMPs, так и на PAMPs, в зависимости от типа рецептора. Активация TLR рецепторов приводит к высвобождению антимикробных пептидов, воспалительных цитокинов и хемокинов, TNF- α . Рецепторы этого типа наиболее изучены [69].

Рецепторы семейства NLR в настоящее время изучаются наиболее интенсивно. Они подразделяются на множество подгрупп в зависимости от реакции на DAMP и PAMP. Одними из наиболее изучаемых классов являются

NLR, способные формировать инфламмосомы. К таким рецепторам относятся NLRP1, NLRP3, NLRC4, NLRC5, NLRP6, NLRP7, NLRP12. Существуют также рецепторы типа AIM2 не относящиеся к NLR, но способные формировать инфламмосомы, распознающие чужеродную ДНК. Специфичность функциональная роль NLRP1, NLRC4, AIM2, и NLRP3 изучена наиболее хорошо. Будучи активированными, NLR связываются с ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a C-terminal caspase recruitment domain [CARD]) и формируют мультибелковый комплекс – инфламмосому. Это приводит к расщеплению про-каспазы-1 в ее активную форму. В активной форме каспаза-1 приводит к созреванию и высвобождению про-воспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18 [5].

IL-1 β способен инициировать пролиферацию макрофагов, микроглии и астроцитов, которые концентрируются в месте повреждения. Это является одним из наиболее ранних и значимых признаков нейровоспаления, характерного для ряда нейродегенеративных заболеваний. IL-1 β и IL-18 играют ключевую роль в регуляции врожденного иммунного ответа при нейровоспалении. Существуют данные, демонстрирующие, что IL-1 β и IL-18 вносят существенный вклад в прогрессирование БА [70]. В местах скопления синильных бляшек обнаруживается повышенный уровень микроглии, которая активно секретирует IL-1 β , а при инкубации микроглиальных клеток с A β у них наблюдается высвобождение IL-1 β , активация каспазы-1 и формирование ASC комплекса. У мышей нокаутных по *Asc*^{-/-} и *Casp1*^{-/-} инъекция A β приводит к меньшему накоплению микроглии, чем у дикого типа. Более того, у мышей *APP/PS1/Nlrp3*^{-/-} наблюдается уменьшение каспаза-1-опосредованного процессинга, уменьшение накопления и увеличение фагоцитоза A β в сравнении с мышами *APP/PS1* [5, 7, 71]. Другие инфламмосомы семейства NLR, вероятно, тоже связаны с БА. Было показано, что при БА наблюдается повышенный уровень NLRP1 и NLRC4 инфламмосом [5]. Все это говорит о том, что активация инфламмосом тесно связана с прогрессированием нейродегенерации.

2 Материалы и методы

В работе были использованы лабораторные мыши линии C57BL/6 (WT) и нокаутные по гену *Nlrp3* мыши линии B6.129S6-Nlrp3tm1Bhk/JJ (NLRP3_KO) возрастом P90-P120 (3-4 месяца). Для определения влияния A β на развитие инсулинорезистентности в различных частях лимбической системы моделировалось локальное нейровоспаление путем инъекции A β 1-42 (Sigma-Aldrich, USA) в гиппокамп или мозжечок. A β растворялся в фосфатно-солевом буфере (PBS) до концентрации 50 мкМ с последующей инкубацией при 37 °C в течение 7 дней. 1 мкл A β вводился в гиппокамп и мозжечок со скоростью введения 0,5 мкл в минуту. В качестве контроля проводилась ложная операция с введением PBS с теми же параметрами. Инъекции выполнялись стереотаксически при помощи программы StereoDrive2.11.2 (NeurostarGmbh, USA) по координатам (в мм) AP: -2,5 ML: -1,5/1,5 DV: -2 от брегмы при введении в гиппокамп и от лямбды при введении в кору мозжечка (рис.4

После инъекции в течение 7 дней животные содержались в индивидуальных клетках со свободным доступом к еде и воде при постоянной температуре 21 ± 1 °C и регулярным световым цикле 12 ч день/12 ч ночь. Все операции проводились с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского сообщества (2010/63/ЕС). По истечению 7 дней изготавливались переживающие срезы и производилась запись пВПСП.

2.1 Изготовление переживающих срезов

Каждое животное анестезировалось посредством введения хлоралгидрата внутривентрально в концентрации 400 мг/кг веса животного. Производилась декапитация, мозг вынимался из черепной коробки и охлаждался в ледяном растворе Рингера, перфузируемого 95% O₂ + 5% CO₂ в течение 1 минуты.

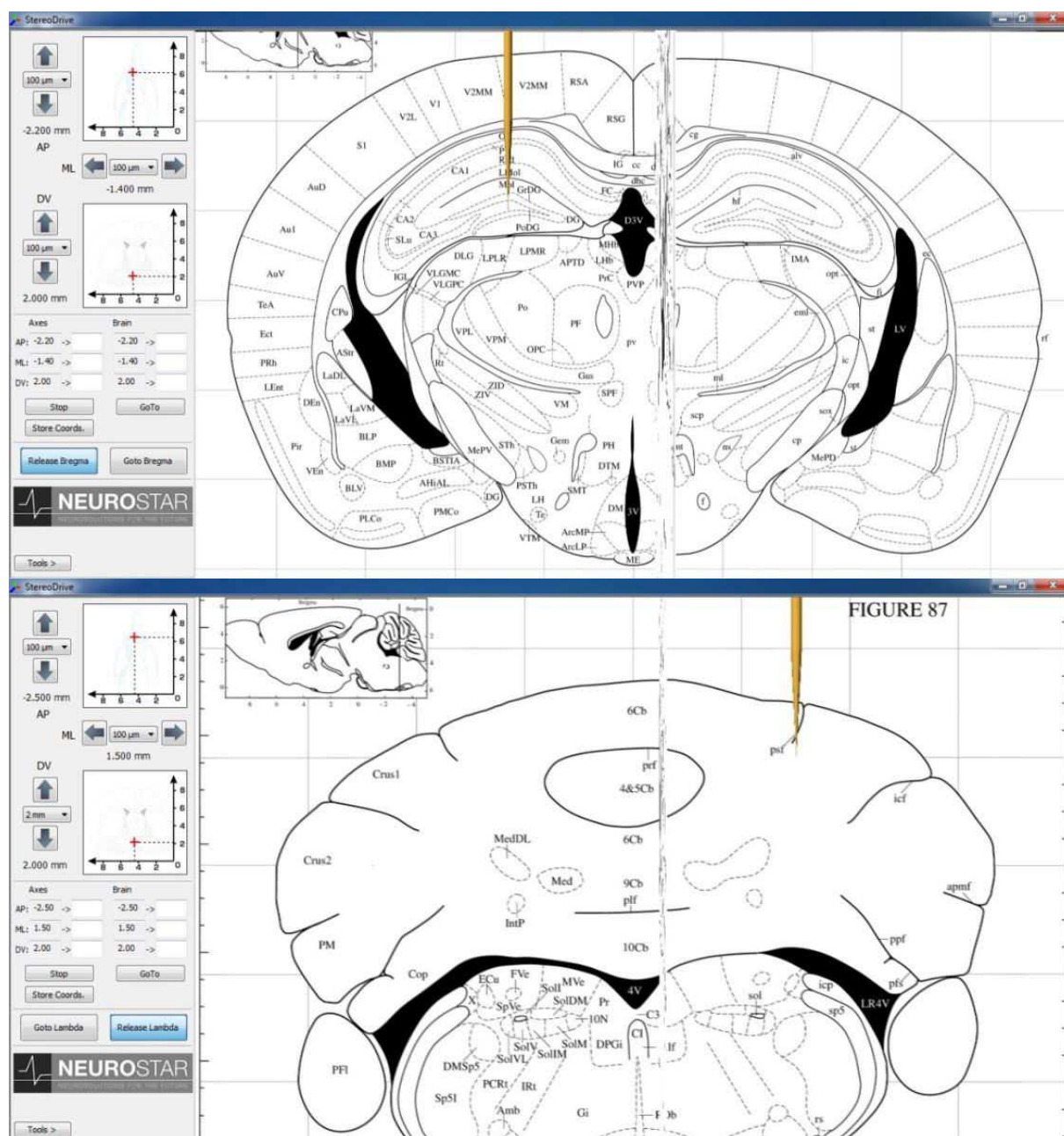


Рисунок 4 – Окно программы Stereodrive. Инъекция в гиппокамп (сверху) и в мозжечок (снизу)

Коронарные переживающие срезы толщиной 350 мкм получали с помощью вибротома ThermoScientific MicromHM650V. Нарезка срезов происходила в растворе Рингера (состав в мМ: 234 фруктоза, 26 NaHCO_3 , 2.5 KCl, 1.25, NaH_2PO_4 , 11 глюкоза, 10 MgSO_4 , и 0.5 CaCl_2) при температуре 4°C и постоянной перфузии $95\% \text{O}_2 + 5\% \text{CO}_2$.

2.2

Запись локальных полевых возбуждающих постсинаптических потенциалов

Переживающие срезы помещались в ванночку, перфузируемую искусственной спинномозговой жидкостью (иСМЖ) (состав в mM: 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 10 глюкоза, pH 7.2) со скоростью ~2 мл/мин и оксигенируемым 95% O₂ + 5% CO₂. Визуализация записываемых и стимулируемых полей происходила с помощью микроскопа Olympus BX51WI. Для записи пВПСП использовался боросиликатный электрод, заполненный иСМЖ, с сопротивлением 5-10 МΩ. Для стимуляции нейронов исследуемых срезов использовался платино-иридиевый микроэлектрод с сопротивлением 5 МΩ. Расположение электродов изображено на рисунке 5. Стимуляция производилась короткими импульсами длительностью 0,1 мсек с амплитудой 3-15 В каждые 3 с.

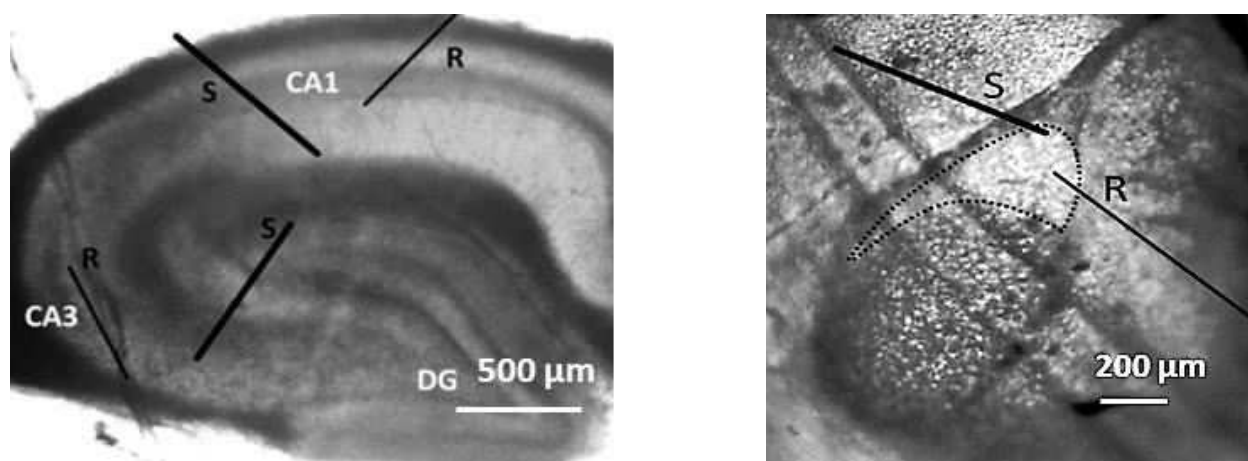


Рисунок 5 – Расположение стимулирующего (S) и записывающего (R) электродов в гиппокампе (слева) и латеральном ядре миндалине (справа)

пВПСП нейронов записывались для оценки суммарной синаптической активности нейронов этих областей. Регистрация данных (фильтр 3 кГц) и преобразование их в цифровой формат происходили с помощью усилителя

НЕКА EPC10. При оценке влияния нокаутирования на электрофизиологические свойства нейронов оценивались следующие параметры: амплитуда пВПСП, время нарастания амплитуды, константа спада амплитуды (τ) и коэффициент усиления парных импульсов (paired-pulse ratio, PPR). Для оценки влияния инсулина на нейроны исследуемых областей, производилась запись контроля в течение 2 минут для стабилизации амплитуды с последующей острой аппликацией инсулином (500 нМ) и дальнейшей записью пВПСП в течение 5 минут. Статистическая обработка данных проводилась при помощи однофакторного дисперсионного анализа и непарного непараметрического критерия сравнения Манна-Уитни. Данные считались достоверными при $p < 0,05$.

3 Результаты и их обсуждение

Изъято 4 страницы

4 Заключение

По результатам выполненной работы можно сделать следующие выводы.

1. Нокаутирование по гену *Nlrp3* оказывает различное влияние на электрофизиологические характеристики нейронов в зависимости от исследуемой зоны.

2. Инсулин вызывает кратковременное и незначительное уменьшение амплитуды пВПСП нейронов латерального ядра миндалины у мышей дикого типа. У мышей нокаутных по гену *Nlrp3*, напротив, наблюдается увеличение амплитуды пВПСП.

3. При интрагиппокампальной инъекции $A\beta$, инсулин не вызывает никаких изменений ни у дикого типа, ни у нокаутных мышей. Таким образом можно заключить, что у нейронов латерального ядра миндалины развивается инсулинорезистентность.

4. В нейронах CA1 зоны гиппокампа инсулин вызывает ДВД у мышей дикого типа. Полученные результаты согласуются с литературными данными.

5. Наличие $A\beta$ в мозжечке приводит к развитию инсулинорезистентности нейронов CA1 зоны гиппокампа. Таким образом, присутствие $A\beta$ в одной зоне мозга способно вызывать патологические изменения в других связанных с ней областях.

Список сокращений

Аβ	–	бета-амилоид
БА	–	Болезнь Альцгеймера
ВПСП	–	возбуждающие постсинаптические потенциалы
ГАМК	–	гамма-аминомасляная кислота
ДВД	–	долговременная депрессия
ДВП	–	долговременная потенция
ИР	–	инсулиновый рецептор
иСМЖ	–	искусственная спинномозговая жидкость
ИФР	–	инсулиноподобный фактор роста
СД2	–	сахарный диабет 2 типа
пВПСП	–	полевые возбуждающие постсинаптические потенциалы
фМРТ	–	функциональная магнитно-резонансная томография
ЦНС	–	центральная нервная система
ЭПР	–	эндоплазматический ретикулум
ACID	–	APP intracellular domain
Akt	–	протеинкиназа B
ASC	–	apoptosis-associated speck-like protein containing a C-terminal caspase recruitment domain [CARD]
AMPA	–	α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты рецептор
APLP1	–	amyloid-precursor-like protein-1
APLP2	–	amyloid-precursor-like protein-2
APP	–	Amyloid-Precursor Protein
BACE1	–	β-site APP-cleaving enzyme, β-секретаза
CaMKII	–	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II
CK2	–	casein Kinase 2
DAMPs	–	damage-associated molecular patterns

EOFAD – Early-Onset Familial Alzheimer’s Disease
ERK – extracellular signal–regulated kinase
GLUT – транспортер глюкозы
Grb-2 – growth factor receptor-bound protein 2
GSK3 β – glycogen synthase kinase 3 beta
IDE – insulin degrading enzyme
IP3R – inositol 1,4,5-trisphosphate receptor
IRS-1 – insulin receptor substrate 1
JNK-1 – c-Jun N-terminal kinase-1
LOAD – Late Onset Alzheimer’s Disease
nAChR – никотиновый ацетилхолиновый рецептор
NCX – sodium/calcium exchanger
NLR – NOD-like receptor
NMDAR – N-метил-D-аспартата рецептор
PAMPs – pathogen-associated molecular patterns
PDK – фосфоинозитид-зависимая протеинкиназа
PIP2 – фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфат
PIP3 – фосфатидилинозитола 3,4,5-трифосфата
PPR – paired-pulse ratio
PRR – pattern recognized receptor
ROCC – receptor-operated calcium channels
RyR – ryanodine receptor
SERCA – sarcoendoplasmic reticulum calcium ATPase
SH2 – Src homology 2 domain
SOCC – store-operated calcium channels
TLR – toll-like receptor
TNF- α – tumor necrosis factor alpha
VOCC – voltage-operated calcium channels

Список использованных источников

1. Tam J.H.K. Alzheimer's Disease / J.H.K. Tam, S.H. Pasternak // *The Cerebral Cortex in Neurodegenerative and Neuropsychiatric Disorders* / eds. D.F. Cechetto, N. Weishaupt. – London: Elsevier Inc., 2017. – P. 83-118.
2. Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма. В 2-х томах. Том 1 / Под ред. М.В. Угрюмова. – Москва: Научный мир, 2014. – 580 p.
3. Bedse G. Aberrant insulin signaling in Alzheimer's disease: Current knowledge / G. Bedse et al. // *Frontiers in Neuroscience*. – 2015. – Vol. 9. – № 204. – P. 1-13.
4. Verdile G. Inflammation and Oxidative Stress: The Molecular Connectivity between Insulin Resistance, Obesity, and Alzheimer's Disease / G. Verdile et al. // *Mediators of Inflammation*. – 2015. – Vol. 2015.
5. Freeman L.C. The pathogenic role of the inflammasome in neurodegenerative diseases / L.C. Freeman, J.P.Y. Ting // *Journal of Neurochemistry*. – 2016. – Vol. 136. – P. 29-38.
6. Kandimalla R. Is Alzheimer's disease a Type 3 Diabetes? A critical appraisal. Vol. 1863 / R. Kandimalla, V. Thirumala, P.H. Reddy. – 2017.
7. Heneka M.T. Neuroinflammation in Alzheimer's disease / M.T. Heneka et al. // *The Lancet Neurology*. – 2015. – Vol. 14. – № 4. – P. 388-405.
8. Skaper S.D. An Inflammation-Centric View of Neurological Disease: Beyond the Neuron / S.D. Skaper et al. // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2018. – Vol. 12. – P. 72.
9. Vandanmagsar B. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. / B. Vandanmagsar et al. // *Nature medicine*. – 2011. – Vol. 17. – № 2. – P. 179-88.
10. Felice F.G. De. Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: Insulin signaling prevents the pathogenic binding of A β oligomers / F.G. De Felice et

al. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2009. – Vol. 106. – № 6. – P. 1971-1976.

11. Zhao W.-Q. Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors / W.-Q. Zhao et al. // The FASEB Journal. – 2007. – Vol. 22. – № 1. – P. 246-260.

12. Bertram L. Chapter 3 – The Genetics of Alzheimer's Disease / L. Bertram, R.E. Tanzi // Progress in Molecular Biology and Translational Science. – 2012. – Vol. 107. – P. 79-100.

13. Galzitskaya O. V. Studies of the Process of Amyloid Formation by A β Peptide / O. V Galzitskaya, E.I. Galushko, O.M. Selivanova // Biochemistry (Moscow). – 2018. – Vol. 83. – № S1. – P. S62-S80.

14. Dawkins E. Insights into the physiological function of the β -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. / E. Dawkins, D.H. Small // Journal of neurochemistry. – 2014. – Vol. 129. – № 5. – P. 756-69.

15. Heber S. Mice with Combined Gene Knock-outs Reveal Essential and Partially Redundant Functions of Amyloid Precursor Protein Family Members / S. Heber et al. // The Journal of Neuroscience. – 2000. – Vol. 20. – № 21. – P. 7951-7963.

16. Haass C. Trafficking and proteolytic processing of APP / C. Haass et al. // Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. – 2012. – Vol. 2. – № 5. – P. 1-25.

17. Demuro A. Calcium signaling and amyloid toxicity in Alzheimer disease / A. Demuro, I. Parker, G.E. Stutzmann // Journal of Biological Chemistry. – 2010. – Vol. 285. – № 17. – P. 12463-12468.

18. LaFerla F.M. Alzheimer's disease: Ab, tau and synaptic dysfunction / F.M. LaFerla, S. Oddo // Trends in Molecular Medicine. – 2005. – Vol. 11. – № 4. – P. 170-176.

19. Selkoe D.J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years / D.J. Selkoe, J. Hardy // EMBO Molecular Medicine. – 2016. – Vol. 8. – № 6. – P. 595-608.

20. Lane C.A. Alzheimer's disease / C.A. Lane, J. Hardy, J.M. Schott //

European Journal of Neurology. – 2018. – Vol. 25. – № 1. – P. 59-70.

21. Klunk W.E. Amyloid and neurodegeneration: converging and diverging paths. / W.E. Klunk, D. Perani // Neurology. – 2013. – Vol. 81. – № 20. – P. 1728-9.

22. Stoothoff W.H. Tau phosphorylation: Physiological and pathological consequences / W.H. Stoothoff, G.V.W. Johnson // Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease. – 2005. – Vol. 1739. – № 2. – P. 280-297.

23. Allen B. Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. / B. Allen et al. // The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience. – 2002. – Vol. 22. – № 21. – P. 9340-9351.

24. Oddo S. A β immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome / S. Oddo et al. // Neuron. – 2004. – Vol. 43. – № 3. – P. 321-332.

25. Tokutake T. Hyperphosphorylation of Tau induced by naturally secreted amyloid- β at nanomolar concentrations is modulated by insulin-dependent Akt-GSK3 β signaling pathway / T. Tokutake et al. // Journal of Biological Chemistry. – 2012. – Vol. 287. – № 42. – P. 35222-35233.

26. Lambert M.P. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. / M.P. Lambert et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1998. – Vol. 95. – № 11. – P. 6448-53.

27. Molnár Z. Enhancement of NMDA responses by beta-amyloid peptides in the hippocampus in vivo. / Z. Molnár et al. // Neuroreport. – 2004. – Vol. 15. – № 10. – P. 1649-52.

28. Sokolow S. Isolation of synaptic terminals from Alzheimer's disease cortex / S. Sokolow et al. // Cytometry Part A. – 2012. – Vol. 81A. – № 3. – P. 248-254.

29. Puzzo D. Picomolar Amyloid- Positively Modulates Synaptic Plasticity and Memory in Hippocampus / D. Puzzo et al. // Journal of Neuroscience. – 2008. – Vol. 28. – № 53. – P. 14537-14545.

30. Li S. Soluble A β oligomers inhibit long-term potentiation through a

mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors. / S. Li et al. // The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience. – 2011. – Vol. 31. – № 18. – P. 6627-38.

31. Sperling R.A. Functional alterations in memory networks in early alzheimer's disease / R.A. Sperling et al. // NeuroMolecular Medicine. – 2010. – Vol. 12. – № 1. – P. 27-43.

32. Magi S. Intracellular Calcium Dysregulation: Implications for Alzheimer's Disease / S. Magi et al. // BioMed Research International. – 2016. – Vol. 2016.

33. Zhang Z. A novel acetylcholinesterase inhibitor and calcium channel blocker SCR-1693 improves Abeta-impaired mouse cognitive function / Z. Zhang et al. // Psychopharmacology (Berl). – 2015.

34. Rani A. Protective effect of a calcium channel blocker “diltiazem” on aluminum chloride-induced dementia in mice / A. Rani et al. // Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. – 2015. – Vol. 388. – № 11. – P. 1151-1161.

35. Wang X. Exendin-4 antagonizes A β 1-42-induced suppression of long-term potentiation by regulating intracellular calcium homeostasis in rat hippocampal neurons / X. Wang et al. // Brain Research. – 2015. – Vol. 1627. – P. 101-108.

36. Ferreira E. Involvement of endoplasmic reticulum Ca²⁺ release through ryanodine and inositol 1,4,5-triphosphate receptors in the neurotoxic effects induced by the amyloid- β peptide / E. Ferreira, C.R. Oliveira, C.M.F. Pereira // Journal of Neuroscience Research. – 2004. – Vol. 76. – № 6. – P. 872-880.

37. Ferreira E. An endoplasmic-reticulum-specific apoptotic pathway is involved in prion and amyloid-beta peptides neurotoxicity / E. Ferreira et al. // Neurobiology of Disease. – 2006. – Vol. 23. – № 3. – P. 669-678.

38. Jensen L.E. Alzheimer's disease-associated peptide A β 42 mobilizes ER Ca²⁺ via InsP3R-dependent and -independent mechanisms / L.E. Jensen et al. // Frontiers in Molecular Neuroscience. – 2013. – Vol. 6.

39. Fonseca A.C.R.G. Amyloid-Beta Disrupts Calcium and Redox Homeostasis in Brain Endothelial Cells / A.C.R.G. Fonseca et al. // Molecular

Neurobiology. – 2015. – Vol. 51. – № 2. – P. 610-622.

40. Brawek B. Network-wide dysregulation of calcium homeostasis in Alzheimer's disease / B. Brawek, O. Garaschuk // Cell and Tissue Research. – 2014. – Vol. 357. – № 2. – P. 427-438.

41. Dal Prà I. Do astrocytes collaborate with neurons in spreading the “infectious” A β and Tau drivers of Alzheimer's disease? / I. Dal Prà et al. // Neuroscientist. – 2015. – Vol. 21. – № 1. – P. 9-29.

42. Freiherr J. Intranasal insulin as a treatment for alzheimer's disease: A review of basic research and clinical evidence / J. Freiherr et al. // CNS Drugs. – 2013. – Vol. 27. – № 7. – P. 505-514.

43. Kim B. Insulin resistance in the nervous system / B. Kim, E.L. Feldman // Trends in Endocrinology and Metabolism. – 2012. – Vol. 23. – № 3. – P. 133-141.

44. Asano T. Role of phosphatidylinositol 3-kinase activation on insulin action and its alteration in diabetic conditions. / T. Asano et al. // Biological & pharmaceutical bulletin. – 2007. – Vol. 30. – № 9. – P. 1610-6.

45. Sesti G. Pathophysiology of insulin resistance / G. Sesti // Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism. – 2006. – Vol. 20. – № 4. – P. 665-679.

46. Zdychová J. Emerging role of Akt kinase/protein kinase B signaling in pathophysiology of diabetes and its complications. / J. Zdychová, R. Komers // Physiological research. – 2005. – Vol. 54. – № 1. – P. 1-16.

47. Blázquez E. Insulin in the brain: Its pathophysiological implications for states related with central insulin resistance, type 2 diabetes and alzheimer's disease / E. Blázquez et al. // Frontiers in Endocrinology. – 2014. – Vol. 5. – № OCT. – P. 1-21.

48. Marks J.L. Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization / J.L. Marks et al. // Endocrinology. – 1990. – Vol. 127. – № 6. – P. 3234-3236.

49. Mameli M. Rapid synthesis and synaptic insertion of GluR2 for mGluR-LTD in the ventral tegmental area / M. Mameli et al. // Science. – 2007. – Vol. 317. –

№ 5837. – P. 530-533.

50. Schulingkamp R.J. Insulin receptors and insulin action in the brain: Review and clinical implications / R.J. Schulingkamp et al. // Neuroscience and Biobehavioral Reviews. – 2000. – Vol. 24. – № 8. – P. 855-872.

51. Obici S. Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats / S. Obici et al. // Nature Neuroscience. – 2002. – Vol. 5. – № 6. – P. 566-572.

52. Arias P. Effect of insulin on LHRH release by perfused hypothalamic fragments / P. Arias et al. // Neuroendocrinology. – 1992. – Vol. 56. – № 3. – P. 415-418.

53. Ryu B.R. Phosphatidylinositol 3-kinase-mediated regulation of neuronal apoptosis and necrosis by insulin and IGF-I / B.R. Ryu et al. // Journal of Neurobiology. – 1999. – Vol. 39. – № 4. – P. 536-546.

54. Rensink A.A. Insulin inhibits amyloid beta-induced cell death in cultured human brain pericytes / A.A. Rensink et al. // Neurobiol Aging. – 2004. – Vol. 25. – № 1. – P. 93-103.

55. Auer R.N. Insulin, blood glucose levels, and ischemic brain damage / R.N. Auer // Neurology. – 1998. – Vol. 51. – № Issue 3, Supplement 3. – P. S39-S43.

56. Labouebe G. Insulin induces long-term depression of ventral tegmental area dopamine neurons via endocannabinoids / G. Labouebe et al. // Nat Neurosci. – 2013. – Vol. 16. – № 3. – P. 300-308.

57. Ahmadian G. Tyrosine phosphorylation of GluR2 is required for insulin-stimulated AMPA receptor endocytosis and LTD / G. Ahmadian et al. // The EMBO Journal. – 2004. – Vol. 23. – № 5. – P. 1040-1050.

58. Jin Z. Insulin reduces neuronal excitability by turning on GABAA channels that generate tonic current / Z. Jin et al. // PLoS ONE. – 2011. – Vol. 6. – № 1. – P. 1-8.

59. Gabuzda D. Inhibition of energy metabolism alters the processing of amyloid precursor protein and induces a potentially amyloidogenic derivative / D. Gabuzda et al. // Journal of Biological Chemistry. – 1994. – Vol. 269. – № 18. –

P. 13623-13628.

60. Gasparini L. Stimulation of beta-amyloid precursor protein trafficking by insulin reduces intraneuronal beta-amyloid and requires mitogen-activated protein kinase signaling. / L. Gasparini et al. // The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience. – 2001. – Vol. 21. – № 8. – P. 2561-2570.

61. Leissring M. a. Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. / M. a Leissring et al. // Neuron. – 2003. – Vol. 40. – № 6. – P. 1087-93.

62. Farris W. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. / W. Farris et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2003. – Vol. 100. – № 7. – P. 4162-7.

63. Zhao L. Insulin-degrading enzyme as a downstream target of insulin receptor signaling cascade: implications for Alzheimer's disease intervention / L. Zhao et al. // J Neurosci. – 2004. – Vol. 24. – № 49. – P. 11120-11126.

64. Bomfim T.R. An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease-associated A β oligomers / T.R. Bomfim et al. // Journal of Clinical Investigation. – 2012. – Vol. 122. – № 4. – P. 1339-1353.

65. Felice F.G. De. Alzheimer's disease and insulin resistance: translating basic science into clinical applications. / F.G. De Felice // The Journal of clinical investigation. – 2013. – Vol. 123. – № 2. – P. 531-9.

66. Son S.M. Altered APP processing in insulin-resistant conditions is mediated by autophagosome accumulation via the inhibition of mammalian target of rapamycin pathway / S.M. Son et al. // Diabetes. – 2012. – Vol. 61. – № 12. – P. 3126-3138.

67. Rodriguez-Rodriguez P. Tau hyperphosphorylation induces oligomeric insulin accumulation and insulin resistance in neurons / P. Rodriguez-Rodriguez et al. // Brain. – 2017. – Vol. 140. – № 12. – P. 3269-3285.

68. Martinon F. The inflammasomes: guardians of the body / F. Martinon, A.

- Mayor, J. Tschopp // Annual review of immunology. – 2009. – Vol. 27. – P. 229-265.
69. Gay N.J. Structure and Function of Toll Receptors and Their Ligands / N.J. Gay, M. Gangloff // Annual Review of Biochemistry. – 2007. – Vol. 76. – № 1. – P. 141-165.
70. Ojala J. Expression of interleukin-18 is increased in the brains of Alzheimer's disease patients / J. Ojala et al. // Neurobiology of Aging. – 2009. – Vol. 30. – № 2. – P. 198-209.
71. Heneka M.T. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice / M.T. Heneka et al. // Nature. – 2012. – Vol. 493. – № 7434. – P. 674-678.
72. Pitkanen A. Reciprocal Connections between the Amygdala and the Hippocampal Formation, Perirhinal Cortex, and Postrhinal Cortex in Rat: A Review / A. Pitkanen et al. // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2006. – Vol. 911. – № 1. – P. 369-391.
73. Wang X. Functional Genomics of Brain Aging and Alzheimers Disease: Focus on Selective Neuronal Vulnerability / X. Wang, M. L. Michaelis, E. K. Michaelis // Current Genomics. – 2010. – Vol. 11. – № 8. – P. 618-633.
74. Arrigo A. Constrained spherical deconvolution analysis of the limbic network in human, with emphasis on a direct cerebello-limbic pathway / A. Arrigo et al. // Frontiers in Human Neuroscience. – 2014. – Vol. 8. – № December. – P. 1-11.
75. Liu W. A Direct Hippocampo-Cerebellar Projection in Chicken / W. Liu et al. // Anatomical Record. – 2012. – Vol. 295. – № 8. – P. 1311-1320.
76. Yu W. Cognitive Collaborations: Bidirectional Functional Connectivity Between the Cerebellum and the Hippocampus / W. Yu, E. Krook-Magnuson // Frontiers in Systems Neuroscience. – 2015. – Vol. 9. – № December. – P. 1-10.
77. Hoxha E. Excitability and synaptic alterations in the cerebellum of APP/PS1 mice. / E. Hoxha et al. // PloS one. – 2012. – Vol. 7. – № 4. – P. e34726.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А.1 – Изменение инсулиновой сигнализации при нормальном старении и при БА[3]

Объект/ткань	Компонент сигнальной системы	Наблюдение
Старение		
крысы/гиппокамп	IGF-1 IGF-2	нет изменений уровня IGF-1, IGF-2 или инсулина
люди/плазма	IGF-1	↓ IGF-1 с возрастом
fisher 344 × brownNorway гибриды крыс/плазма и СМЖ	IGF-1 IGF-1R IGFBP*	↓ мРНК и уровень белка у пожилых животных
старые C57BL6 мыши / весь мозг, сыворотка и СМЖ	IGF-1	↓ IGF-1 в мозге, СМЖ и сыворотке ↑ IGF-1R в гиппокампе ↓ IGF-1R/Akt/GSK3 сигнального пути
Болезнь Альцгеймера		
пациенты с БА / гиппокамп, кора и мозжечок	IGF-II рецептор манозы -6-фосфат	без изменений
пациенты с БА / префронтальная, височная, теменная, затылочная кора	инсулин ИР С-пептид	- увеличение концентрации иммунореактивного инсулина в пирамидальных нейронах больных - уровень инсулина и С-пептида без изменений - увеличение плотности ИР
пациенты с БА / префронтальная кора, гиппокамп, гипоталамус	инсулин, ИР IGF-1, IGF-1R IGF-2, IGF-2R мРНК	↓ ИР и мРНК IGF-1R в гиппокампе и гипоталамусе ↓ мРНК инсулина и IGF-2 в гиппокампе и гипоталамусе, IGF-1 в коре ↓ инсулин-, IGF-1-, ИР- и IGF-1R-позитивных нейронов в гиппокампе ↓ ИР и IGF-1R в гиппокампе ↓ тирозин-фосфорилированных ИР, IGF-1 и IRS-1 в гиппокампе, коре и гипоталамусе ↓ IRS-2 в гиппокампе ↓ фосфорилированных Акти GSK3
пациенты с БА / плазма, сыворотка	IGF-1 IGFBP	↑ общего и не связанного уровня IGF-1 ↑ IGF-1 и IGFBP в сыворотке и СМЖ

Продолжение приложения А

Продолжение таблицы А.1

Объект/ткань	Компонент сигнальной системы	Наблюдение
	инсулин	↓ инсулина при мягких когнитивных нарушениях - позитивная корреляция уровня инсулина с $A\beta_{1-42}$
пациенты с БА / височная кора	IGF-1R IGFBP-2	изменение распределения, но не уровня экспрессии ИР ↓ IGF-1R ↓ IGFBP-2 ↑ IGF-1R в астроцитах в окружении бляшек ↓ уровня экспрессии IRS-1 и IRS-2
пациенты с БА, трижды трансгенные мыши, культура нейронов гиппокампа крыс	IRS-1	↑ активной JNK и уровня фосфорилированного IRS-1pSer ⁶¹⁶ ↑ IRS-1pSer ⁶¹⁶ колокализованного с NFTs $A\beta$ индуцирует экспрессию IRS-1pSer ⁶¹⁶ в культурах нейронов шиппокампа
пациенты с БА / гиппокамп, кора	инсулин IGF-1 IRS-1	- нет изменений в общем уровне инсулина и IGF-1 - тенденция к увеличению уровня IRS-1 в гиппокампе ↓ ответа на инсулин в системе ИР→ IRS-1→ PI3K - позитивная корреляция фосфорелированных форм IRS-1pS ⁶¹⁶ и IRS-1pS ^{636/639} с амилоидными бляшками и памятью
пациенты с БА / фронтальная кора	инсулин IGF-1 IRS-2	↓ инсулин, IGF-1 и IGF-2 рецепторных мРНК ↓ связанного инсулина меченного по ¹²⁵ I, IGF-1 и IGF-2
крысы с инъекцией $A\beta$ / культуры нейронов гиппокампа и коры	фосфорилирование ИР по Tyr	↓ фосфорилирования ИР ↑ фосфорилирования Akt по Ser ⁴⁷³
пациенты с БА / плазма	IGF-1	↓ уровня IGF-1 в плазме у больных наследственной формой БА с мутацией APP670/671
пациенты с БА / сыворотка и СМЖ	IGF-1 IGF-2 IGFBP	↑ IGF-2 в сыворотке и СМЖ ↑ IGF-1 в сыворотке ↑ IGFBP в СМЖ

пациенты с БА / СМЖ и плазма	инсулин	↓ инсулина в СМЖ и отношения СМЖ/плазма ↑ инсулина в плазме
------------------------------	---------	--

Окончание приложения А

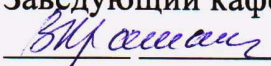
Окончание таблицы А.1

Объект/ткань	Компонент сигнальной системы	Наблюдение
пациенты с БА / кора	инсулиновая сигнализация	↓ общего числа и фосфорилированных компонент сигнального пути инсулин-PI3K-Akt
пациенты с БА / кора и гиппокамп	IRS-1	↑ фосфорилированных форм IRS1-pS ⁶¹⁶ , IRS1- pS ³¹² и Akt-pS ⁴⁷³ положительная корреляция IRS1-pS ⁶¹⁶ с таупатией
пациенты с БА / плазма	инсулин	↑ инсулина в плазме после орального теста толерантности к глюкозе ↑ уровня инсулина в СМЖ
трансгенные мыши (Tg2576) с БА	IGF	↓ уровня IGF в сыворотке
IGF-1R, insulin growth factor receptor 1; IGF-2R, insulin growth factor receptor 2; IRS-1, insulin receptor substrate-1; IRS-1pSer636/639, IRS-1 phosphorylated at serine residues 636/639; JNK, c-Jun N-terminal kinase; PI3K, phosphatidyl inositol 3-kinase; CSF, cerebrospinal fluid		

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Изъята една страница

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологий
институт
кафедра биофизики
кафедра

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

подпись инициалы, фамилия
« 14 » 06 20 18 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Влияние β -амилоида на развитие инсулинорезистентности нейронов головного

мозга

тема


03.04.02 Физика

код и наименование направления

03.04.02.01 Биофизика

код и наименование магистерской программы


Научный руководитель

 К.ф.-м.н. Шубаев А.Н.
подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия


Научный консультант

 К.М.Н. Шубаев А.Н.
подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

Выпускник

 Готаленко И.В.
подпись, дата инициалы, фамилия

Рецензент

 6.06.2018 зам. директора НИИФФМ, д.б.н. Т.Г. Амстиславская
подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

Красноярск 2018